

(10)日本国特許庁 (J P) (12)公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2001-509612  
(P2001-509612A)

(43)公表日 平成13年7月24日(2001.7.24)

識別記号		F I		チ-コ-ド (参考)	
(51)IntCl. <sup>7</sup>		G 0 2 B	21/06		
(86) (22)川瀬日		C 1 2 M	1/00	A	
(86) (22)川瀬日		C 1 2 Q	1/68	E	
(86) (22)川瀬日		G 0 1 N	21/64	F	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く					
(71)出願人 ルブレヒト-カールス-ウニヴェルジター ト ハイデルベルク					
(72)発明者 ミヒャエル ハウスマン ドイツ連邦共和国 ルートヴィッヒスハー フェン パウル-レーベ-シュトラッセ 4					
(73)発明者 クリストフ クレーマー ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク モム ペルトブラッツ 23					
(74)代理人 井野士 矢野 敏雄 (外4名)					
最終頁に続く					

(54) [発明の名称] ウェーブフィールド顕微鏡、ウェーブフィールド顕微鏡法、DNA配列決定のためのウェーブ  
フィールド顕微鏡法、およびウェーブフィールド顕微鏡に対する修正方法

(57) [要約]

本発明は、2つの新たなウェーブフィールド顕微鏡タイプ1とタイプ11に関する。これらの顕微鏡は、それぞ  
れ励起および照明システムを有し、このシステムは少な  
くとも1つのリアル照明源およびパーチャル照明源と、  
少なくとも1つの対物レンズ (タイプ1の場合)、な  
いしは2つの対物レンズ (タイプ11の場合) を有する。  
ここにおいて照明源および対物レンズは次のように相互  
に配置される。すなわち、1つの二次元または3次元定  
在ウェーブフィールドを対象空間に形成するのに適する  
よう配置される。本発明の修正方法は、このウェーブ  
フィールド顕微鏡に適合しており、蛍光色素マーキングさ  
れた対象構造体の幾何学的関係の正確な決定することので  
き、この関係は有効点集分布関数の主最大値の半値幅よ  
りも小さく、本発明はさらに、ウェーブフィール  
ド顕微鏡法DNA配列決定のための方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 照明ないし励起システムと、対象空間と、検知システムとを  
有し、

前記照明ないし励起システムは、照明源と、第1の対物レンズと、第2の対物  
レンズまたは反射器とを有し、

第1の対物レンズと、第2の対物レンズまたは反射器とは、これらが一次元の  
定在ウェーブフィールドを形成するのに適するように相互に配置されており、

前記対象空間は、対象物に対する保持および操作装置を有し、

前記検知システムは、対物レンズ、接眼レンズおよび検知器を有する形式の、  
ウェーブフィールド顕微鏡において、

前記照明ないし励起システムは、2つまたは3つすべての空間方向に、コヒー  
レントな光ビームに対する少なくとも1つのリアル照明源またはパーチャル照明  
源と、部分ビームを出力結合するための少なくとも1つの反射器またはビームス  
プリッタ、またはコヒーレントな光ビームに対する別の照明源とを有し、

前記部分ビームにはそれぞれ1つの対物レンズが配置されており、かつ当該部  
分ビームは光波シケンケンスを形成するのに適したものであり、

照明源の1つの光波シケンケンスは、反射器ないしは別の照明源の光波シケン  
スに対して逆並列に、または可変調整可能な角度で配向されており、

当該配向は、前記照明源の1つから発する光波シケンケンスが、反射器ないしは  
別の照明源の光波シケンケンスにより、平坦な波面を有する定在ウェーブフィール  
ドに干渉されるようになされており、

検知システムは、エビシカ検知に適合した、および/またはラスタ状の点検知に  
適した少なくとも1つの検知対物レンズを有し、

該検知対物レンズの開口数は有利には大きく、当該対物レンズの光軸は干渉ウ  
ェーブフィールドの1つの波面に対して垂直に配置されており、

当該検知対物レンズは励起システムの対物レンズと同じであってよく、

エビシカ検知に適合した検知対物レンズには平坦な (2次元) 検知器、例えばカ  
メラが前置されており、ラスタ状の点検知に適合した検知対物レンズには少なくと

も1つの固定基準点検知リングがありおよび/またはは検知ホールがあり、および/ま

たは少なくとも1つの固定の検知スリットが前置されており、かつ点検知器、とりわけフォトマルチプライヤ、フォトダイオード、またはダイオードアレイが後置されている。

ことを特徴とするウェーブファイールド顕微鏡。

【請求項2】 少なくとも1つの空間方向で、開口数の大きな対物レンズに開口数の小さな対物レンズまたは反射器が配属されており、別の1つのまたは2つの空間方向で、開口数の小さい2つの対物レンズ、または開口数の小さい対物レンズと反射器とが相互に配属されている。請求項1記載のウェーブファイールド顕微鏡。

【請求項3】 照明ないし励起システムと、対象空間と、検知システムとを有するウェーブファイールド顕微鏡であって、

前記照明ないし励起システムは、照明源と対物レンズとを有し、当該照明源と対物レンズとは相互に、定在ウェーブファイールドを形成するのに適するように配属されており、

前記対象空間は、対象物に対する検出および検出装置を有し、

前記検知システムは、対物レンズ、検出レンズおよび検出器を有する形式のウェーブファイールド顕微鏡において、

前記照明ないし励起システムは、3つの空間方向の少なくとも1つに、コヒーレントな光ビームに対する少なくとも1つのリアル照明源またはパーチャル照明源と、少なくとも1つの部分ビームを出力結合するための少なくとも1つのビームスプリッタとを有し、

前記照明源とビームスプリッタには共通の1つの対物レンズが配属されており

該対物レンズに、照明源および/またはビームスプリッタの光ビームないしは光波シケンスが入力結合可能であり、

これら光ビームないしは光波シケンスは、後方（対象空間の反対側）焦点面に相互に間隔をおいた2つの焦点を有し、かつ2つの焦点面の間の空間で可変調可能な角度で相互に延在し、1つの一次元定在ウェーブファイールドに干渉し、前記検知システムは、エビ星光検知に適した、および/またはラスタ状の点検

知に適した少なくとも1つの検知対物レンズを有し、

該検知対物レンズの開口数は有利には大きく、かつ当該検知対物レンズは励起システムの対物レンズと同じでもよく、

エビ星光検知に適した検知対物レンズには平坦な（二次元）検出器、例えばカメラが前置されており、

ラスタ状の点検知に適した検知対物レンズには少なくとも1つの固定共焦点検知リング絞りおよび/または検知ホール絞り、および/または少なくとも1つの固定検知スリットが前置されており、点検知器、とりわけフォトマルチプライヤ、フォトダイオードまたはダイオードアレイが後置されており、

ことを特徴とするウェーブファイールド顕微鏡。

【請求項4】 照明ないし励起システムは、同じまたは別の1つまたは2つの空間方向に、コヒーレントな光ビームに対するそれぞれ少なくとも1つの別のリアル照明源またはパーチャル照明源、および/または少なくとも1つの部分ビームを出力結合するための少なくとも1つのビームスプリッタを有し、

当該部分ビームには、それぞれ1つの別の対物レンズが配属されており、

当該対物レンズによって光ビーム（光波シケンス）が対象空間に偏向され、次のように配向されている、すなわちこれら光ビームが同じ、または別の1つまたは2つの空間方向から発した光ビーム、ないしはこれにより形成された一次元または二次元のウェーブファイールドにより、1つの二次元ないし3次元ウェーブファイールドに干渉するように配向されている、請求項3記載のウェーブファイールド顕微鏡。

【請求項5】 対象空間は対象物ホルダを有し、

該対象物ホルダには、測定検出器および/または場合により校正ターゲットを有する対象物が1つまたは2つの相互に直交して延在する軸を中心に回転可能にウェーブファイールド内で支承され、

少なくとも1つの軸に対しては $360^\circ$ （ $2\pi$ ）の回転性が有利である。請求項1から4までのいずれか1項記載のウェーブファイールド顕微鏡。

【請求項6】 多次元ウェーブファイールドを形成する照明源、および/または反射器、および/またはビームスプリッタ、および/または対物レンズ、および

び3次元ウェーブフィールドは、1つまたは2つの相互に直交して延在する軸を中心に戻転可能である。請求項1から5までのいずれか1項記載のウェーブフィールド顕微鏡。

【請求項7】 検知システムには走査ミラーが設けられており、検定走査ミラーは、側方対象領域を所望の有利に最大蛍光強度で結像するのに適するように配向されている。請求項1から6までのいずれか1項記載のウェーブフィールド顕微鏡。

【請求項8】 照明システムは、3つの空間方向の少なくとも1つに、2またはマルチ蛍光励起のためのリアル照明源を有し、さらに別の1つまたは2つの空間方向に2またはマルチ蛍光励起のためのリアルおよびまたはバーチャル照明源を有し、

当該照明源は、これにより形成された相互に異なる波長  $(\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_l)$  の定在ウェーブフィールド (WFI, WFI, WFI, WFI) と、それぞれ  $d_1 = \lambda_1 / 2 \cdot n \cdot \cos \theta_1$  ないし  $d_2 = \lambda_2 / 2 \cdot n \cdot \cos \theta_2$  ないし  $d_l = \lambda_l / 2 \cdot n \cdot \cos \theta_l$  である最大波ないし最小波間の間隔  $(d_1, d_2, \dots, d_l)$  を有し (ただし、 $n$  = 対象空間における屈折率、 $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_l$  = 波長が  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_l$  である光波シークেনスと光軸との交差角)、

ウェーブフィールドWFI, WFI, WFIは相互に、2つまたはすべての定在波の少なくとも最大が同じ箇所 (すなわちマルチフォトン励起の箇所) に発生するように配向されている。請求項1から7までのいずれか1項記載のウェーブフィールド顕微鏡。

【請求項9】 照明源、対物レンズ、および一次元電気ウェーブフィールドを形成するのに適した導電性ミラーの配置構成が、対象物支持体ホルダに対して相対的に設けられており、対象物に存在する測定構造体および/または校正ターゲットが電界の印刷によって顕微鏡測定過程の前、または測定中に整列可能である。請求項1から8までのいずれか1項記載のウェーブフィールド顕微鏡。

【請求項10】 請求項1から9までのいずれか1項記載のウェーブフィールド顕微鏡を使用して、DNA順序決定するためのウェーブフィールド顕微鏡法において、

分析すべきDNAシークエンスのすべての相補サブシークエンスを、すべての相補サブシークエンスが分析すべきシークエンスの同じヌクレオチドで開始するように作成し、

分析すべき断片を、すべての3' エンドにおいて基質蛍光色素マーカ  $\alpha$  により、5' エンドおよび/または所定の中間箇所において蛍光色素  $a, g, c$  または  $i$  により、それぞれヌクレオチド、ベースがアデニン (マーカ  $a$ )、グアニン (マーカ  $g$ )、シトシン (マーカ  $c$ ) またはチミン (マーカ  $i$ ) をキャリーしているかに応じてマーキングし、

ここで蛍光色素マーカ  $a, g, c, i$  および  $\alpha$  は異なるスペクトル署名を有し、それぞれ1つまたは複数の蛍光色素分子を含んでおり、

マーキングされたDNAサブシークエンスをキャリアに固定し、これらが線形のシークエンスとして存在し、多次元ウェーブフィールド顕微鏡にもたらされるようにし、

線形DNAサブシークエンスを定在断面に対して、 $\alpha$  と、 $a$  ないし  $g, c$  または  $i$  との間の正確な間隔測定 (精度  $\leq 1 \cdot 10^{-10}$  m) が強度重心の検出と結像特性の校正後に実行可能であるように配向し、

蛍光色素マーカの信号をステッピングごとにスペクトル分離して相互に記録し、

蛍光マーカの間のスペクトル署名とから、分析すべきDNA部分のDNAベースシークエンスを検出する、

ことを特徴とするDNA順序決定するためのウェーブフィールド顕微鏡法。

【請求項11】 該当する対象物を対象物ホルダ、とりわけ対象物支持プレート、対象物支持ファイバ、対象物支持毛細管、または対象物支持液体に準備する前、断面中、または断面後に、探索すべきないし位置決めすべき対象構造体 (同じ測定構造体) を異なるまたは同じスペクトル署名の蛍光色素によりマーキングし、

ここで少なくともとも、その相互の間隔が有効点像分布関数の主成分値よりも小さい、このように位置決めすべき測定構造体をスペクトル署名の異なる蛍光色素によってマーキングし、

同じ蛍光色素により、所定の大きさおよび空間的構成の校正ターゲットをマー

キングし、

蛍光発光する校正ターゲットを、対象物と共に測定構造物と共に、または別個に対象物ホルダに準備し、

測定構造物および校正ターゲットを、一致条件の下で同時にまたは順次顕微鏡的に検査し、

スペクトル署名の異なるそれぞれ2つの所定の校正ターゲットを、それぞれの光学系の波長に依存する結像または位置決め特性を考慮して測定し、

ここで検出された測定値（すなわち真値）を既知の真値の間隔値（すなわち目標値）と比較し、

真値と目標値との差から補正値（すなわち校正値）を検出し、

当該補正値により、光学系に起因するずれを、種々の放射焦点、とりわけ測定構造物の像の面に補正する校正方法において、

蛍光色素マーキングされた測定構造物および/または蛍光色素マーキングされた校正ターゲットを有する生物学的対象物をシーケンシャルにまたは同時に、個々の（別個の）2つまたは3つの空間方向で直交して相互に存在する定在の、1つの二次元または三次元ウェーブフィールドに相互に干渉するウェーブフィールド非戸により照明し、ここで蛍光色素を蛍光放射のために励起し、

蛍光強度を検知するために、カメラおよび/または1つまたは複数の二次元階成体を使用し、

当該二次元階成体は、それぞれ円形、リング、またはスリット状の絞りを有する個別検知器からなるか、または複数の円形、リング、またはスリット状の絞りをからなる階成体であり、

測定構造物および/または校正ターゲットを有する対象物、または一次元ないし二次元ウェーブフィールド、または両方を測定過程中にスラップごとに1つまたは2つの直交して存在する軸を中心に回転し、

ここで蛍光色素マーキングされた測定構造物および/または校正ターゲットを、シーケンシャルにまたは同時に、1つまたは2つの個別に相互に直交するウェーブフィールドにより照明する、  
ことを特徴とする校正方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、照明ないし励起システムと、対象空間と、検知システムとを有するウェーブフィールド顕微鏡に関する。ここで前記照明ないし励起装置は、少なくとも1つのリアル照明源およびパーシャル照明源と、少なくとも1つの対象レンズを有し、照明源および対象レンズは、一次元のウェーブフィールドを形成するのに適するように配置されている。前記対象空間は、対象物に対するホルダと像作装置を有する。また前記検知システムは、対象レンズ、検限レンズ、および検知器を有する。本発明はさらに、蛍光色素マーキングされた対象物構造物間の幾何学的間隔測定のための校正方法に関する。ここで対象物構造物間の間隔は、有効点像分布関数の主最大値の半値幅よりも小さくてもよい。さらに本発明は、ウェーブフィールド顕微鏡によるDNA順序決定のための方法に関する。

【0002】

従来の技術

高特異的マーカー、例えばDNA試料またはプロテインゾンドを使用することにより、生物学的（微細）対象物、とりわけ細胞、細胞核、細胞器または染色体（以下、単に対象物と称する）でほとんど任意に小さな（サブ）構造物をマーキングすることができる。このような数 $\mu\text{m}$  ( $10^{-6}\text{m}$ ) から数 $10\text{nm}$  ( $10^{-9}\text{m}$ ) の次元にある構造物を特異的に表示することができる。マーカーは通常は蛍光色素またはコロイド状微細（金）粒子と結合しており、その光学的検知および結像を容易にし、これを初めて可能にする。

【0003】

同じ対象物内で2つのマーカーを相互に別個に検知するために、該当するマーカーはしばしば色の異なる蛍光色素と結合される。通常使用される蛍光色素の色放射スペクトルは、深い青から緑、赤を越え、赤外線スペクトル領域にまでわたる。しかし励起スペクトルでも蛍光スペクトルでも区別できず、その蛍光放射寿命が区別のためのパラメータとして利用される蛍光色素が使用されることもある。このことの利点は、波長に依存する焦点シフトが発生しないことである。蛍光色素はまた種々異なる放射スペクトルを有することもあり、従って異なるスペクトル

署名を有することもある。しかしこれは同じ光子エネルギーで、例えばマルチフ  
ォトンプロセスにより励起できる。この場合も波長に依存する焦点シフトを、  
スペクトル署名が異なる蛍光色素間での励起で回避することができる。

#### [0004]

このような、生物学的微細対象物において特異的な(サブ)構造体と結合可能  
または結合した蛍光色素を以下、蛍光色素マーカと称する。

#### [0005]

2つの蛍光色素マーカの励起スペクトルおよび/または放射スペクトルおよび  
/または蛍光寿命が一致すれば、この蛍光色素マーカは該当するパラメータの点  
で同じスペクトル署名を有している。測定に関連する1つまたは複数のパラメー  
タにおいて蛍光色素マーカが異なれば、これらは異なるスペクトル署名を有する

#### [0006]

蛍光とは以下、同じ物質の励起スペクトルと放射スペクトルとの間で用途が発  
生し、この相違が単色吸収または散乱によるものではあり得ない、いずれかの光  
子相互作用であると理解されたい。これはとりわけ多光子交互作用も含み、この  
交互作用では励起波長が放射波長よりも長くなることがある。

#### [0007]

さらにここで概念「蛍光」は、これに密接に結びついた発光現象、とりわけ燐  
光に対しても使用される。これは比較的に長い平均蛍光寿命、例えば数msから  
数10msの順位の蛍光寿命を含む。以下、密に結びついた発光、蛍光、および  
燐光の過程を本発明では同じように取り扱う。

#### [0008]

拡張された生物学的対象物、および定義された対象点/対象構造体に関する最  
適位置決め(間隔および角度測定)での蛍光色素マーカの検知と結像は、光学顕  
微鏡的測定方法によって実行される。ここではいわゆる“点像分布関数”(point  
spread function=PSF)、または使用される顕微鏡または光学系一般の“点応  
答”、すなわち理想点形状の対象物から同じように理想的な点形状の画像を形成  
する能力が重要である。点像分布関数は結像光学系の特性を表し、結像光学系の

品質に対する尺度である。

#### [0009]

対象構造体間の間隔測定は、有効点面像分布関数に実質的に依存する。有効と  
は、マークされた対象点の局所位置により与えられるという意味である。この有  
効点面像分布関数もまた、それぞれの局所的屈折率および対象物での吸収、すな  
わち対象物の埋め込み媒体、浸没流体、およびカバーガラスでの吸収に大きく依  
存する。

#### [0010]

有効点面像分布関数は一般的に、使用される顕微鏡に対して計算された点面像  
分布関数とは大きく異なる。技術的に最適化された周辺条件の下で測定された点  
像分布関数も通常、実験的にルーチン実験条件の下で生物学的対象物で達成され  
た有効点像分布関数とは異なる。

#### [0011]

なぜなら有効点像分布関数は多くの場合得られるものではなく、間隔測定の較  
正は計算された理想結果に基づくか、または標準条件の下で実行された校正測定  
に基づいて行われるからである。これは例えば反射方法である。しかし2つの方  
法は、生物学的対象物における3次元間隔測定の際には精度に問題がある。その  
結果、対象構造体間の実際の空間的間隔の検出が著しく不確実になり、生物学的  
対象物の場合はこのような不確実性の量的推定は数 $\mu\text{m}$ まで含まれる。

#### [0012]

最近まで当該専門分野では、全員の概念があった。すなわち、2つの対象  
構造体は、これらが有効点像分布関数の主最大値の少なくとも半値幅だけ相互に  
離れている場合にだけ分離することができると言うものである。

#### [0013]

1996年に初めて、本願の発明者は、遠隔視野顕微鏡(および蛍光分析)に対  
する較正方法を提案した。これによれば、その相互間の間隔が該当する遠隔視野  
微鏡の分解能よりも小さい、すなわち有効点像分布関数の主最大値の半値幅より  
も小さい対象構造体間の間隔測定が、該当する対象構造体の3次元空間における  
位置に依存しないで高精度で実行可能である。

## 【0014】

この方法は次のステップを有する：

- ・該当する対象物の対象物ホルダ、とりわけ対象物支持プレート、対象物支持ファイバ/毛細管または対象物支持流体での準備前、準備中または準備後に、探索すべきまたは位置決めすべき対象物（測定対象物）を、異なるおよび/または同じスペクトル署名の蛍光色素によりマークし、すなわち、相互にごく近傍にあり、その有効点画像分布関数の主最大値の半値幅内にある、位置決めすべき構造体（測定構造体）をスペクトル署名の異なる蛍光色素によりマークし、その相互間隔が有効点画像分布関数の主最大値の半値幅よりも大きい測定構造体をスペクトル署名の異なるまたは同じ蛍光色素によりマークする。位置決めすべき2つの測定構造体は、これらが例えばその相対位置または別の基準により一義的に識別できる場合には常に同じスペクトル署名によりマークしなければならない。

## 【0015】

- ・同じ蛍光色素により、所定の大きさおよび空間的配置構成の校正ターゲットを同じ蛍光色素によりマークする。

## 【0016】

- ・蛍光発光する校正ターゲットを対象物と共にまたは別個に、対象物ホルダ（対象物支持プレート、対象物支持ファイバ/毛細管、対象物支持流体等）に西偏する。

## 【0017】

- ・（直接）対象物および校正ターゲットを一致条件の下で同時にまたは順次、顕微鏡でまたは蛍光分析法で探査する。

## 【0018】

- ・スペクトル署名の異なるそれぞれ定義された2つの校正ターゲットを、それぞれの光学系（顕微鏡または流体蛍光計）の波長に依存する結像特性またはローカリゼーション特性を考慮して測定し、ここで検出された測定値、すなわち実測値を既知の実際の間隔値、すなわち日標値（すなわち幾何形状に基づいて計算された目標ローカリゼーション）と比較し、実測値と日標値との差、すなわち校正値が、とりわけ測定対象物の種々の放射箇所を検知における光学系に起因するずれ

を補正するために使用される。

## 【0019】

言い換えれば：（相互間の間隔に応じて）異なるまたは同じスペクトル署名によりマークされた対象（サブ）構造体（以下、測定構造体と称する）間の間隔測定が、相応のスペクトル署名と既知の大きさおよび空間的配置構成を備えた独立の（校正）ターゲットの高精度の位置決めに基づき、それぞれの光学系の波長に依存する結像特性およびローカリゼーション特性を考慮して実行される。ここで（校正）ターゲット間の校正測定と生物学的対象物の測定とは同じシステム条件および周辺条件の下で行われる。この校正ターゲットは、測定すべき（対象）構造体と同じまたはそれより高いマルチスペクトル性を有する。校正ターゲットは生物学的対象物に直接配置することができる。または別個のプレパレートとして対象物ホルダ（対象物支持プレート、または対象物支持ファイバ/毛細管、または対象物支持流体等）に存在するか、または対象物ホルダの一部とすることができ、

## 【0020】

無償の3次元生物学的対象物における2つまたは3つの測定構造体であって、その間隔および広がりがある効点画像分布関数の主最大値の半値幅よりも小さいものも、そのスペクトル署名（蛍光吸収波長および/または蛍光放射波長および/または蛍光放射寿命）の異なることに基づいて弁別することができ、その相互間隔を検出することができる。

## 【0021】

間隔測定は個々の測定構造体の位置決めに還元され、光学的遠視野顕微鏡またはは蛍光分析計でも、点像分布関数の主最大値の半値幅よりも格段に高い精度により実行することができる。該当する測定構造体の重心の位置決めは、その蛍光信号の最大強度に適合される。すなわち、蛍光点（＝蛍光測定構造体）の測定された（回折に制限された）信号（強度曲線）から、主最大値と副最大値からの全体情報を考慮して、信号の重心が検出され、ひいては測定構造体の位置が検出される。光学系にエラーがなく、その結果、測定された強度分布（＝強度曲線の経過）が理想的に対称であれば、強度曲線の重心は位置決め精度内で、測定された強

度分布の主最大値 (= 回折後の0次最大値) と位置的に一致する。この新たな校正方法によって、光学的遠視野顕微鏡並びに例えばウェーブフィールド顕微鏡を用い (または走査光分析計を用いても)、生物学的微細対象物の幾何学的間隔を測定することができる。ここでは検出すべき間隔は、対象物における有効点像強度分布関数の主最大値の半値幅より小さくてもよい。これにより実行された間隔測定の情報内容は、分解能が向上された際に得られる間隔測定に相当し、(以下) 省略して“等価分解能”について述べることができる。

## [0022]

マルチスベクトル校正によって、システムの性能特性についての  $\ln \text{ situ}$  測定を具体的な生物学的対象物で実行することができる。蛍光寿命を一般的にパラメータ形式として使用する場合、および/または蛍光色素を同じ光子エネルギーにより励起する場合には、対象物面における半値幅の  $\ln \text{ situ}$  補正は校正によりより簡便される。高分解能の遠視野顕微鏡、例えばウェーブフィールド顕微鏡に対して、適切な蛍光色素マーカを使用すれば、この校正方法により3次元幾何形状の間隔測定を生物学的対象物においてナノレベルの精度 (すなわち10 nm以下) の等価分解能で) で実行することができる。

## [0023]

補正値/校正値を比較および検出するための実験値と目標値の検出のために有利には次の方法ステップが実行される。

## [0024]

N個の測定構造体の重心から有効点像分布関数の主最大値の半値幅よりも大きな間隔を有する1つまたは複数の校正ターゲットBを任意のスペクトル署名によりマークする。

## [0025]

N個の測定構造体のスペクトル的に分離された回折フィギュアの重心の間隔  $d_{ik}$  ( $i, k = 1 \dots N, i \neq k$ ) と、校正ターゲットBに対するN個の測定構造体の間隔  $d_{is}$  を測定し、画像分析の自動方法を用いる。

## [0026]

測定構造体に対して区間  $d_{ik}$  と  $d_{is}$  をもっとも細い点像分布関数の平面で測定

し、並びに他のすべての間隔を測定する。このために対象物を軸方向トモグラフィックにそれぞれ所定の角度  $\phi_s$  だけ回転する。

## [0027]

校正測定からの光学的収差を補正し、補正された測定された間隔  $d_{ik}(\phi_s)$  と  $d_{is}(\phi_s)$  に対してそれぞれ適切な位相シフトを伴うコサイン関数  $A_{ik} \cos(\phi_s + \phi_{ik})$  ないしは  $A_{is} \cos(\phi_s + \phi_{is})$  を適合する。

## [0028]

$d_{ik}$  ないしは  $d_{is}$  の適合関数の最大値  $A_{ik}$  と  $A_{is}$  を拡大係数により割り算し、N個の測定構造体相互間のユークリッド間隔  $D_{ik}$  ないしは  $D_{is}$ 、または基準点Bに対する測定構造体の間隔を検出する。

## [0029]

最大値の検出に対しては有利には付加的に、これに相応する間隔  $z_{ik}$  の最小値を  $d_{ik}$ 、 $d_{is}$  の平面に対して直交する平面で検出して同様に評価する。

## [0030]

N個の測定構造体のすべての座標の検出および基準点Bに対するその相対的座標、すなわち位置  $x_i, y_i, z_i$  および  $x_k, y_k, z_k$  の位置、ないしは間隔  $x_k - x_i, y_k - y_i, z_k - z_i$  および  $x_s - x_i, y_s - y_i, z_s - z_i$  の検出は本発明により、顕微鏡で測定された3D間隔  $D_{ik}$  乃至  $D_{is}$  を基礎として、有利には次の等式を使用して行う。

## [0031]

$$D_{ik}^2 = (x_k - x_i)^2 + (y_k - y_i)^2 + (z_k - z_i)^2$$

$$D_{is}^2 = (x_s - x_i)^2 + (y_s - y_i)^2 + (z_s - z_i)^2$$

$$D_{is}^2 = (x_s - x_k)^2 + (y_s - y_k)^2 + (z_s - z_k)^2$$

検出された測定結果が確實にするため、前に説明した方法ステップを複数の校正ターゲットBに対して、同じN個の測定構造体に対して実行すべきである。

## [0032]

N個の測定構造体の座標および間隔は重心に基づいて検出することができ、この重心はすべての基準点に対する測定の重心検出から得られる。

## [0033]

とりわけグラフィック表示に対しては、検出された位置  $x_1, y_1, z_1$  および  $x_0, y_0, z_0$  を有利には点像分布関数により読み込む。この点像分布関数はそれぞれ達成された空間分解能による半値幅を有している。

#### [0034]

測定構造体および校正ターゲットを蛍光色素マーキングするために、有利には紫外線、可視光線および/または赤外線波長領域で励起でき、紫外線、可視光線および/または赤外線波長領域で検出することのできる蛍光色素を使用する。

#### [0035]

校正ターゲットとして生物学的校正ターゲットまたは非生物学的でない合成校正ターゲットを使用することができる。

#### [0036]

生物学的校正ターゲットは、相互に既知の間隔を有する生物学的対象物のマーキングされた領域とすることができる。該当する領域のマーキングは適切な生化学的ゾンデにより実行することができる。このような生物学的校正ターゲットを使用すること、合成校正ターゲット、例えば校正小球を使用することに対する実質的利点は、校正の際に対象物の光学的周辺条件の他に付加的に特異的周辺条件が校正に影響を与えることである。これは例えば、実際の蛍光信号と非特異的背景との比である（自動的画像分析アルゴリズムによって検出される）。

#### [0037]

非生物学的校正ターゲットでない合成校正ターゲットとして特に微小小球が適する。この微小小球は、位置決めすべき測定構造体と同じか、またはこれより高いマルチスペクトル署名を有する。この微小小球は生物学的対象物と同じように取り扱われる。このような校正ターゲットは有利には対象物ホルダに所定の空間的配置構成で固定される。この固定は、該当する対象物ホルダを複製する際に行うことができる。このことはルーチン利用に対して特に有利である。

#### [0038]

点像分布関数の主最大値の幅、ひいては分解能限界は、空間における相対位置に依存して、例えば光軸に対して垂直（＝側方）には、光軸の方向（＝軸方向）に

おけるよりも細いという公知のすべての遠隔視野顕微鏡法において存在する問題を除去するために、前記の校正方法を従来技術で公知のいわゆる微細軸トモグラフィ法と非常に良好に組み合わせることができる。この微細軸トモグラフィ法では、（生物学的）対象物が毛細管またはガラスファイバに配置され、顕微鏡下で所定のように軸、通常は顕微鏡の光軸に対して垂直な軸を中心に回転される。このときに間隔測定が、有効点像分布関数のもっとも狭い半値幅を有する方向で実行される。

#### [0039]

遠隔視野顕微鏡法は、生物学的対象物における非常に小さい、蛍光色素マーカによって識別されるサブ構造体を検知および結像するのに特に適する。なぜなら、公知のエピ蛍光顕微鏡法または共焦点レーザ走査顕微鏡に対して、軸方向にも、すなわち波面に対して垂直にも深い弁別度を有しており、格段に良好な分解が可能だからである（その次元は開口数が高い場合には、励起に使用する光の波長よりも格段に小さくすることができる）。これがウェーブフィールド顕微鏡法である。

#### [0040]

ウェーブフィールド顕微鏡では、米国特許第4629111号に記載されているように、蛍光または蛍光プレパラートが光学的顕微鏡で定化したウェーブフィールドにより照明される（定在波フィールド蛍光顕微鏡法、SWFM）。定在するウェーブフィールドは、光がコヒーレントに重畳される箇所に（だけ）発生する。プレパラートは等間隔の平坦波面ゾーンに配置され、蛍光発光または蛍光発光のために励起される。波面とその相との間隔は（とりわけ画像形成のために）変化することができる。個々の光学的断面から、コンピュータ画像処理によって、蛍光発光または蛍光発光する対象物点の3次元分布を再現することができる。

#### [0041]

平坦な波面は検知された対象物の光軸に対して垂直に配置されており、2つのレーザビームを顕微鏡系の光軸に対して所定の角度  $0^\circ$  でコヒーレントに重畳することにより形成される。ここで角度  $\theta$  は、波長と屈折率が定まっている場合には波面相互間の間隔を定める。直交する2つのレーザビームの代わりに、ウェー



(17)

ンファイナードを次のようにして形成することができる。すなわち、レーザビームを所定の角度で適切に反射した（例えばミラーによる）後、それ自体を干渉させるのである。平坦な表面は次のことを特徴とする。すなわち、強度経路が断面に対して垂直の方向に（コ）サイン形状である。

[0042]

拡光発光ないしは発光光は相応の光学的フィルタによりスベクトル弁別され、種々異なるビーム路に案内される。または共焦点検知される。達成可能な解像度、すなわち同じスベクトル署名の蛍光色素によりマークされた2つの点状対象構造間の最小検知可能間隔は、アッペルト基準（＝第1の点対象物の回折面像の0次最大は第2の点対象物の回折面像の1次最小の中に位置決めされる）により、または有効点像分解数の最大値の半値幅により与えられる。これはそれぞれの波長、使用される対物レンズの開口径、並びに対象物、検め込み媒体、場合により使用されるカバーガラスおよび撮合により使用される浸没液体の局所的屈折率に依存する。

[0043]

公知のウェーブファイナード顕微鏡は基本的に次のように構成される。この顕微鏡は次の要素を有する。

[0044]

(1) 照明系ないしは励起系。これらは少なくとも1つのリアル照明源およびバークナル照明源と、少なくとも1つの対物レンズからなり、これらは1次元、正位波状のウェーブファイナードを形成するのに適するように相互に配置されている。

[0045]

(11) 対象物に対するホルダと撮装要素を有する対象空間。

[0046]

(111) 検知システム。検知システムは、少なくとも1つの対物レンズと、少なくとも1つの検眼鏡レンズと、少なくとも1つの検知器とからなり、しばしばカメラ、とりわけCCDカメラであり、CCDチップが中間面後面に来るよう配置されている。

(18)

[0047]

この従来の技術によるウェーブファイナード顕微鏡（以下、1次元ウェーブファイナード顕微鏡（SWFM）と称する）の欠点、ないしこれにより克服可能なウェーブファイナード顕微鏡法の欠点は、周期的に形成されるウェーブファイナード（光学的セクションング法と関連したエドギング検知において）のために対象構造が多義的に記録ないし結像され、その広がり波面に対して垂直方向に $\lambda/2n$ よりも格段に大きいことである（ $\lambda$ =励起の波長、 $n$ =有効屈折率）。この多義性のために、干渉パターンにより達成される解像度改善の効率的利用がまず困難となる。

[0048]

間隔測定を要行し、3次元対象物の空間的關係をさらに際立たせるために、公知の遠視野顕微鏡法は、一次元ウェーブファイナード顕微鏡法も含めて、軸トモグラフィ法と組み合わせることができる。このために際立たすべき生物学的対象物、場合により校正ターゲットを装備した後、対象物ホルダないし対象物支持体としての毛細管またはガラスファイバに準備される。毛細管/ファイバは正側に定義された直径を有し、ここでは種々異なる直径が可能である。この毛細管/ファイバは顕微鏡に設定するために特別のホルダが提案される。このホルダは剛性の、有利には背屈部が扁平化されたフレームからなり、これに少なくとも1つの支承ブッシュが取り付けられている。このブッシュ内には毛細管またはガラスファイバをその長手軸を中心に回転させることができるよう支承することができる（有利には回転軸は顕微鏡の光軸に対して垂直に延在するよう配置しなければならない。）毛細管/ファイバにおける波長対象物の回転は、毛細管/ファイバの回転により直後、または有利には回転モータを使用して行う。

[0049]

本発明の課題は、公知の形式のウェーブファイナード顕微鏡をさらに改善し、平坦なウェーブファイナードを1次元以上で形成するのに、干渉最大の間隔の変異性が高い場合でも適するようにすることである。さらに前記の校正方法をさらに改善し、このようなウェーブファイナード顕微鏡と組み合わせ使用可能であるよう

にする。さらにウェーブフィールド顕微鏡IDNA順序決定のための方法を提供するものである。

#### [0050]

この課題の解決手段は、一方では以降のいわゆる“多次元ウェーブフィールド顕微鏡”にあり、他方では同じように後で説明する多次元ウェーブフィールド顕微鏡の適用に適した較正方法にある。さらに“蛍光DNA順序決定”のための方法が提案される。

#### [0051]

本発明による“多次元ウェーブフィールド顕微鏡”(タイプ1)では、冒頭に述べた形式のウェーブフィールド顕微鏡が取り扱われる。この顕微鏡は以下にリストアップした特徴を有する。

#### [0052]

(1) 照明系ないしは励起系が、2つまたは3つすべての空間方向に、コヒーレントな光ビームに対する少なくとも1つのリアル照明源またはパーチャル照明源を有し、少なくとも1つの反射器またはビームスプリッタを部分ビームを出力結合するために有し、さらにコヒーレントな光ビームに対する別の照明源を有する。これらの光ビームにはそれぞれ少なくとも1つの対物レンズが配属されており、それぞれ光シークケンスを形成するのに適するものである。ここで照明源の1つの光波シークケンスは逆並列または可変調整可能な角度で反射器ないし他の照明源の光波シークケンスに対して配向されている。そして照明源の1つから発する光波シークケンスは反射器ないしは他の照明源の光波シークケンスにより、平坦な波面を有する1つの定在的ウェーブフィールドに干渉される。

#### [0053]

(2) 検知システムは、エビ並光検知に適したおおよび/またはラスタ状の点検知に適した少なくとも1つの検知対物レンズを有する。この対物レンズは有利に開口数が大きく、その光軸は干渉ウェーブフィールドの波面に対して垂直に配属されており、励起系の対物レンズと同じであってよい。エビ並光検知に適した検知対物レンズには扁平な(2次元)検知器、例えばカメラが設置されており、ラスタ状の点検知に適する検知対物レンズには少なくとも1つの固定の非焦点検

知リング絞りおよび/または検知ホール絞りおよび/または少なくとも1つの固定の検知スリットが設置されており、点検知器、とりわけフォトマルチプライヤ、フォトダイオード、またはダイオードアレイが後置されている。

#### [0054]

開口数が大きいとは、ここでは開口数 $\geq 1$ であり、開口数小さいとは、開口数 $< 1$ であると理解されたい。

#### [0055]

ウェーブフィールド顕微鏡(タイプ1)の特に有利な実施形態では、少なくとも1つの空間方向で、開口数の大きな対物レンズに開口数の小さな対物レンズまたは反射器が配属されており、別の1つまたは2つの空間方向で、開口数の小さい2つの対物レンズまたは開口数の小さい対物レンズと反射器が相互に配属されている。

#### [0056]

本発明の“多次元ウェーブフィールド顕微鏡”(タイプ1)では、冒頭に述べた形式のウェーブフィールド顕微鏡が取り扱われる。この顕微鏡は次の特徴を有する。

#### [0057]

(1) 照明系ないし励起系は、3つの空間方向の少なくとも1つに、コヒーレントな光ビームに対する少なくとも1つのリアル照明源またはパーチャル照明源を有し、少なくとも1つのビームスプリッタを少なくとも1つの部分ビームを出力結合するために有し、これら光ビームには共通の対物レンズが配属されており、この対物レンズに照明源およびビームスプリッタの光ビームないし光波シークケンスを次のように入力結合することができる。すなわち、これら光ビームないし光波シークケンスが(対象空間の反対側の)後方焦点面に、相互に間隔をおいた2つの焦点ポイントを形成し、2つの焦点面の間の空間で可変調整可能な角度で相互に定在し、1次元の定在ウェーブフィールドに干渉するように入力結合することができる。

#### [0058]

(2) 検知システムは、エビ並光検知に適したおおよび/またはラスタ状の点検知

に近した少なくとも1つの検知対物レンズを有し、この検知対物レンズは有利には開口数が大きく、動起系の対物レンズと同じであってよい。エビ散光検知に適した検知対物レンズには平面な2次元検知器、例えばカメラが前置されており、ラスタ状の点検知に適した検知対物レンズには少なくとも1つの固定の共焦点検知リング絞りおよび/または検知ホール絞りおよび/または少なくとも1つの固定の検知スリットが前置されており、点検知器、とりわけフォトマルチップライヤ、フォトダイオード、またはダイオードアレイが後置されている。

## [0059]

ウェーブフィールド顕微鏡(タイプ11)の有利な実施例では、照明系ないし動起系は同じ空間方向、または別の1つまたは2つの空間方向に、コヒーレントな光ビームに対するそれぞれ1つの別のリアル照明またはバーチャル照明を、および/または少なくとも1つの部分ビームを出力結合するための少なくとも1つのビームスプリッタを有し、これらの部分ビームにそれぞれ1つの別の対物レンズが配賦されており、この対物レンズにより光ビーム(光ビームケーンズ)が対象空間に偏向され、次のように配向される。すなわちこれらが、同じ空間方向または別の2つの空間方向から発する光ビームにより、またはこれにより形成された1次元または2次元ウェーブフィールドにより、2次元または3次元ウェーブフィールドに干渉するように配向される。

## [0060]

前記の本発明のウェーブフィールド顕微鏡全体(タイプ1と11)で非常に有利な別の改善形態では、対象空間が対象物ホルダを有し、このホルダに測定構造体および/または場合により校正ターゲットを備えた対象物が1つまたは相互に直交して延在する2つの軸を中心にウェーブフィールド内で回転可能に支承され、少なくとも1つの軸に対しては $360^\circ$ ( $2\pi$ )の回転性が有利である。

## [0061]

この本発明の多次元ウェーブフィールド顕微鏡タイプ1とタイプ11により、時間的に連続して、および/または同時に複数の対象面を1つ、2つおよび/または3つの対物レンズ(ないしはこれらに直交する軸)によって実行することができ、スペクトル署名が同じまたは異なり、間隔が有効点像分布関数の主最大

値の半値幅よりも小さい点状対象物の精密間隔測定を(すべての)空間的方向で行うことができる。

## [0062]

固定の共焦点検知リング絞り、検知ホール絞り、および/または固定の検知スリットを少なくとも1つの適切な光強度検知器と組み合わせれば、対象物をx、y、およびz方向でウェーブフィールドによりラスタ化する有利な手段が得られる(対象物走査またはステージ走査)。

## [0063]

本発明のウェーブフィールド顕微鏡タイプ1と、これにより実行可能なウェーブフィールド顕微鏡法は、とりわけ公知の一次元ウェーブフィールド顕微鏡に対して次のような利点を有する。すなわち側方分解能(すなわち光軸に対して垂直)も軸方向分解能も格段に改善される。扁平な対象物を軸方向で、共焦点システムを使用せずに初めて弁別することができるようになった。さらに対象物を探索しないし記録/データ収集中にラテラル方向にシフトすることができる。画像処理方法および再現方法により、このようにして得られた多量記録から比較的に高い側方分解能が得られる。1つの対物レンズを有する本発明の構造タイプ11はさらに一次元ウェーブフィールドを、エビ散光顕微鏡の光軸に対して垂直に形成するのに適し、これによりその側方分解能を改善するのに適する。

## [0064]

この“多次元ウェーブフィールド顕微鏡”(タイプ1および/またはタイプ11)の別の有利な実施例では、多次元ウェーブフィールドを形成する照明源尾び/または反射器および/またはビームスプリッタおよび/または対物レンズ、および/または多次元ウェーブフィールドが、1つまたは相互に直交して延在する2つの軸を中心に回転可能に配置ないしは取り付けられる。

## [0065]

2次元または3次元のウェーブフィールドに存在する対象物のラテラル対象領域を検知リング絞り、検知ホール絞りないしは検知スリットに結像するために、それぞれ本発明のウェーブフィールド顕微鏡(タイプ1および/またはタイプ11)に走査ミラーを装填することができる。この走査ミラーは該当するラテラル

するエネルギーを送出する場合に蛍光色素分子が励起される。ここでは分子の励起に参与する2つのフォトンが同じ、または異なる波長ないしはエネルギーを有する。異なる波長により ( $\lambda 1, \lambda 2$ ) 同時に発生する励起に対しては、いわゆる"2フォトンウェーブフィールド顕微鏡"の場合、それぞれの空間方向の各々にそれぞれ波長  $\lambda 1$  と  $\lambda 2$  の2つのウェーブフィールドを組み込まなければならぬ。2つの定在ウェーブフィールド (WF1, WF2) の最大波ないしは最小波はここで間隔  $d 1 = \lambda 1 / 2 \cos \theta 1$  ないし  $d 2 = \lambda 2 / 2 n \cos \theta 2$  を有する (ここで  $n$  = 対象空間における屈折率、 $\theta 1, \theta 2$  = 波長  $\lambda 1, \lambda 2$  のレーザビームと光軸との交差角)。一般的に間隔  $d 1$  と  $d 2$  は異なるから、2つのウェーブフィールドは空間方向ごとに次のように配向される。すなわち、2つの定在波の最大値が同じ箇所に存在するように配向される。マルチフォトン効果は次の箇所でだけ発生することができる。すなわち、2つのウェーブフィールドが重なる箇所だけで発生することができる。これにより1つの空間方向のウェーブフィールドの個々の値だけがマルチフォトン励起に使用される。次元が  $d$  より大きい対象物での多重性は、条件  $k 1 d 1 = k 2 d 2$  ( $k 1, k 2$  は整数) を満たす次元で初めて発生する。蛍光マーカーキングされた測定標識体および校正ターゲットのマルチフォトン励起によって、3次元結像の一義性が達成される。

[0069]

2フォトンまたはマルチフォトン励起蛍光励起法を使用することによって、対象物、すなわち対象点、対象ライン、および対象面の高速走査が可能になり、これにより対象物が運動する場合でも改善された結像品質が達成される。

[0070]

本発明の多次元ウェーブフィールド顕微鏡の同様に有利な改形形態では、光原、対物レンズ、および1次元電磁的ウェーブフィールドを形成するのに適した線状ミラーからなる構成体が対象物支持ホルダに対して相対的に設けられ、対象物に存在する測定標識体および/または校正ターゲットを、必要な場合には (例えばこれらが分子鎖に存在する場合) 電界の印加によって、顕微鏡測定標識体または中に整列させることができる。 (このようにして空間的に整列された分子鎖は続いて固定物質に固定することができる。) 本発明のウェーブフィールド顕微

対象領域を所望の、通常は最大の蛍光発光強度で結像するように配置される。

[0066]

本発明の多次元ウェーブフィールド顕微鏡 (タイプ1および/またはタイプ1

1) の特に有利な改形形態では、この顕微鏡は2つまたはそれ以上の光子蛍光励起に適し、いわゆる"マルチフォトン蛍光励起と組み合わされたウェーブフィールド顕微鏡"を有する。この顕微鏡ではそれぞれ照明系が3つの空間方向の少なくとも1つにリアル照明源を2フォトン励起またはマルチフォトン励起のために、別の1つまたは2つの空間方向に1つのリアルおよび/またはバーチャル照明源を2つまたはマルチフォトン励起のために有する。これにより形成された定在ウェーブフィールド (WF1, WF2, ... WFi) は相互に異なる波長 ( $\lambda 1, \lambda 2, \dots, \lambda 3$ ) を有する。それぞれの最大波ないしは最小波との間の間隔 ( $d 1, d 2, \dots, d 3$ ) は  $d 1 = \lambda 1 / 2 n \cos \theta 1$ 、ないし  $d 2 = \lambda 2 / 2 n \cos \theta 2$  ないし  $d i = \lambda i / 2 n \cos \theta i$  ( $n$  = 対象空間における屈折率、 $\theta 1, \theta 2, \dots, \theta i$  = 波長  $\lambda 1, \lambda 2, \dots, \lambda i$  の光波シーケンスと光軸との交差角) である。これら  $n$  ウェーブフィールド WF1, WF2, ... WFi は本発明では次のように相互に配向される。すなわち、2つのまたはすべての定在波の少なくとも1つの最大値が同じ箇所で、すなわちマルチフォトン励起の箇所に存在するように配向される。

[0067]

2フォトン励起またはマルチフォトン励起に対して適した照明源は従来の技術で公知であり、例えば刊行物 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy", Science, Vol. 248, pp. 73-76 (6. April 1990) に記載されている。この照明源は、種々異なる波長のフォトンまたは同じ波長のコヒーレントなフォトンが発生する。

[0068]

1フォトン励起および2フォトン励起またはマルチフォトン励起を組み合わせたことの利点は、スペクトル番号の異なる蛍光色素マーカを同時に励起することである。このことにより間隔測定のエラーを対象物の色覚差に基づいて除去することができる。2フォトン励起の場合には、2つのフォトンが同時に分子を励起

鏡のこの変形実施例は、とりわけウェーブ顕微鏡的DNA順序決定に適し、ここでは1次元電気ウェーブフィールドがDNA順序決定の校正に使用される。

#### [0071]

蛍光発光を検知するために有利にはCCDカメラが公知のように使用される。カメラは検知リング絞りまたは検知ホール絞りまたは検知スリットの後方に配置することができる。CCDカメラないしCCDチップの代わりに、本発明の多次元ウェーブフィールド顕微鏡に電子的画像記録装置を装備することができる。これは、従来の技術の共焦点レーザ走査顕微鏡(CLSM)から公知である。本発明では基本的に、いずれかの感光性検知システム、例えばフォトダイオード、フォトマルチプライヤ、CCDカメラ/チップ、CCDアレイ、アバランシュダイオード、(アバランシュ)ダイオードアレイ、2次元(アバランシュ)ダイオードマトリクスを検知リング絞りまたは検知ホール絞りまたは検知スリットの後方に配置することができる。これは蛍光を検知し、記録し、蛍光寿命測定を行うことができるようにするためである。

#### [0072]

本発明の校正方法は、以下の特徴を有する、吾項に述べた形式の校正方法である。

#### [0073]

(1) 蛍光色素マーキングされた測定標本および/または蛍光色素マーキングされた校正ターゲットを備えた生物学的対象物が連続的にまたは同時に、2つまたは3つの空間方向で相互に直交して延在する、2次元または3次元ウェーブフィールドに対して相互に干渉する定在的な個々の(別個の)ウェーブフィールドにより照明される。ここで蛍光色素は蛍光発光のために励起される。

#### [0074]

(2) 蛍光強度を検知するためにカメラ、および/または個別検知器からなる1つまたは複数の2次元構成体を使用される。個別検知器は、それぞれ円形、リング状、スリット状の絞り、または複数の円形、リング状、スリット状の絞りからなる構成体を有する。

#### [0075]

(3) 測定標本および/または校正ターゲットを備えた対象物または1次元ないし2次元ウェーブフィールド、または両方を測定範囲中にステップごとに1つの軸または相互に直交する2つの軸を中心に回転し、蛍光マーキングされた測定標本および/または校正ターゲットを連続的にまたは同時に、相互に直交する1つまたは2つの個々のウェーブフィールドにより照明する。

#### [0076]

同時照明の場合は、測定標本および校正ターゲットを有する微細対象物が固定されるか、または軸を中心に回転可能に変換される。2つまたは3つの相互に直交して延在する定在的で平坦なウェーブフィールドが干渉され、微細対象物を同時に照明する。ウェーブフィールドが2つの場合には、2次元対格グリッドを備えた面が発生する。このグリッドは最大強度と最小強度の点からなる。3つのウェーブフィールドを使用する場合には、対称性で規則的に配置された、最大強度と最小強度の点からなる3次元空間グリッドが発生する。最大強度と最小強度との間には連続的強度分布が存在する。

#### [0077]

連続照明の場合には、微細対象物をウェーブフィールド中で2つの軸を中心に回転する。検知中または検知後に、ウェーブフィールドの位置を対象物に対して相対的に変化することができる。

#### [0078]

適切な蛍光色素マーカを使用すれば本発明により、スベクトル番号が同じまたは異なる蛍光ターゲット間の3次元(3D)幾何学的間隔測定を分子レベルの精度で行うことができる。すなわち10nmよりも良好な3D等面分解能と、1nmよりも良好な3D位置決め精度によって行うことができる。電子顕微鏡ないし光学のおよび非光学的近接野顕微鏡とは異なり、探索すべき対象物の3次元構造は完全なままである。なぜなら、機械的ステップが省略されるからである。これにより3次元保存微細対象物において、3D間隔測定を有効点線分布関数の主成分大値の半値幅よりも小さい領域で行うことができる。とりわけこの方法により3次元間隔測定を、生物学的対象物の生体条件下で実行することができる。DNA A順序決定の類には、ゲルの作製とDNA片を電気泳動的に分離することが省略

される。同じようにオートラジオグラフも省略することができる。なぜなら放射性マーキングは実行されないからである。良いDNA順序決定（例えば1 kb p）の場合でも試みに分析することができる。

#### [0079]

この本発明の方法変形実施例によりさらに、形態的大小（例えば容積、表面）の検出が段階に改善される。これはマルチスペクトル蛍光色素マークが適切に、例えば対象物の表面に分散される場合である。例えばこのようにして数100 nmの半径の球形微細対象物の容積を、従来の形態学的セグメント化技術を用いる場合よりも良好に検出できる。これは例えば、CavalieriおよびVoronoi法、または容積保存漸次閾値法である。

#### [0080]

本発明の多次元ウェーブフィールド顕微鏡（タイプIおよび/またはタイプII）と本発明の校正方法によって、顕微鏡的DNA順序決定を実行することができる。このために本発明では、以下に説明する“DNA順序決定のためのウェーブフィールド顕微鏡法”が提案される。

#### [0081]

(1) 分析すべきDNAシーケンスのすべての出相的サブシーケンスが次のように作成される。すなわち、すべてのサブシーケンスが分析すべきシーケンスの同じスクレオチドで開始するように作成される。

#### [0082]

(2) 分析すべき破片をすべての3' エンドで基質蛍光色素マークaにより、5' エンドおよび/または所定の中間箇所でも蛍光色素マークa、g、cまたはtによりマーキングする。これはスクレオチドがアデニン（マークa）、グアニン（マークg）、シトシン（マークc）またはチミン（マークt）をキャリアーするかに応じて行う。ここで蛍光色素マークa、g、c、tおよびaは異なるスペクトル署名を有し、それぞれ1つまたは複数の蛍光色素分子を含む。

#### [0083]

(3) マークされたDNAサブシーケンスを次のようにキャリアに固定する。すなわちこれらが線形シーケンスとして存在し、1次元または多次元ウェーブフィ

ールド顕微鏡にもたらされるように固定する。

#### [0084]

(4) 線形DNAサブシーケンスは定在波面に次のように配向される。すなわち、 $\alpha$ とa、g、cまたはtとの正確な間隔測定（精度 $\leq 1 \times 10^{-10}$  m）が、強度重心の検出と結像特性の校正後に実行できるように配向される。

#### [0085]

(5) 蛍光色素マークの情報をステップごとに、相互にスペクトル分離して記録し、

(6) 蛍光色素マークの間隔とそのスペクトル署名から、分析すべきDNA片のDNAベースシーケンスを検出する。

#### [0086]

この従来技術には全く新しい方法により、DNA断片の長さをスケレオチドに正確に測定することができ、そのベースシーケンスも正確に検出することができる。ゲル電気泳動および後続のバンド評価を省略することができる。

#### [0087]

本発明を詳細に説明するための実施例および比較例：

例1：回転可能に支持される対象物を備えたタイプIの多次元ウェーブフィールド顕微鏡の構造

基礎は従来の“一次元ウェーブフィールド顕微鏡”である。この顕微鏡は、開口数の大きな対向する2つの対物レンズを有するか、または開口数の小さい対物レンズと開口数の大きな対物レンズを有するか、または干渉する2つのレーザビームに対する対物レンズを有する。対物レンズによりレーザの2つの部分ビームが次のように干渉される。すなわち、一次元の定在ウェーブフィールドが発生するように干渉される。開口数の大きい1つまたは2つの対物レンズを介して蛍光が検知される。それぞれ検知対物レンズの光軸に対して直交する1つまたは2つの方向で、レーザのそれぞれ2つの別の部分ビームが開口数の小さい対物レンズおよび/または焦点レンズ系を介して適切な間隔で入力結合され、相互に一次元の定在ウェーブフィールドと干渉される。これにより強度最大値と強度最小値となる2次元または3次元の対称性強度パターンが発生する。

## 【0088】

この“多次元”キューブフィールド顕微鏡に対象物支承のために微細軸トモグラフィが組み込まれる。

## 【0089】

軸トモグラフィでは、ガラス対象物支持体の代わりに毛細管またはガラスファイバが使用され、これらは回転可能に支承され、(生物学的)対象物を収容(毛細管)するか、または(生物学的)対象物が適切に取り付けられる(毛細管/ファイバ)。手動またはコンピュータ制御したステップモータにより、通常は検知対象物レンズの光軸に対して垂直に配置された毛細管/ファイバをファイバ軸を中心に所定の角度だけ回転することができる。360°(2π)の角度の回転も可能である。毛細管/ファイバに対する支持体ホルダは半円に回転可能に支承される。ここで回転軸は検知対象物レンズの光軸に対して垂直に延在する。

## 【0090】

微細ターゲットおよびその間隔の空間的構成の検知は本発明の校正方法とデジタル画像分析を用いて行われる。強度経過の多義性、すなわち蛍光ポイントの強度主最大値と副最大値は適切なコンピュータグラフィズムを用いて統計的に評価することができる。これにより位置決め精度を向上させることができる。対象物が膨張している場合には、多義性は種々異なる波長のフォトンによって2またはマルチフォトン励起することにより低減される。

## 【0091】

例2：多次元キューブフィールド顕微鏡。本発明の校正方法および場合により軸トモグラフィを用いて細胞核内の染色体の遺伝子部分の間隔を測定する。

## 【0092】

(1) 細胞核で個々の染色体のクロマチンは所定の部分領域を取る。このような1つまたは複数の染色体部分領域内で、位置決めすべき構造体、すなわち測定構造体、例えば遺伝子または遺伝子の断片のような小さな染色体部分、従来技術から公知の蛍光法によって *in situ* で特異的にマークされる。すなわち異なる既知のスペクトル署名 M1, M2, M3, ... の蛍光色素によりマークされる。

マッキング箇所の間隔(マークされた測定構造体の間隔)は古典的分解能以下で

ある。すなわちこの間隔は、有効点像分布関数の主最大値の半値幅よりも小さい。(対象)構造体(測定構造体)のマーキングは、スペクトル署名が位置決めすべき構造体(測定構造体)においてほぼ同じダイナミクスにより代理されるように行われる。

## 【0093】

生物学的対象物は正確に所定の直径を有するガラスファイバに、または所定の大きさの丸いまたは矩形の毛細管に挿入される。

## 【0094】

(1) 間隔を抽出するために、校正ターゲットを備えた顕微鏡プレパラートが作製される。すなわち、対象物ないし位置決めすべき対象構造体(=測定構造体)と同じ物理的および化学的浸漬条件の下で作製される。

## 【0095】

校正ターゲットとして、ないしは校正ターゲットを備えたプレパラートとして例えば

a) (山色) スペクトル署名の微細注入された小球を用いる。

## 【0096】

小球は、公知の方法に従いそれぞれ1つの蛍光色素により単色マーキングされ、その大きさに基づいて、対象物(測定構造体)中の測定すべき(位置決めすべき)構造体から区別することができる。次のような校正小球を注入する。すなわち対象物に存在する測定構造体のスペクトル署名を、そうでなければ有利には同じ(大きさ、幾何形状、材料特性等)校正小球を注入する。言い換えれば、測定構造体並びに校正ターゲットのスペクトル署名を次のように選択する。すなわち所与の浸漬条件の下で、これらにより放射された蛍光が相互に別個に分析できるように選択される。単色校正小球の注入と固定は次のように行われる。すなわち、スペクトル署名の異なる個々の小球がクラスで、ガラスファイバ表面または毛細管壁に直接整列され、有利にはファイバないし毛細管の横断面に整列されるように行われる。精密ファイバおよび/または精密毛細管を使用する場合には、小球は相互に所定の間隔で、または基端面、端部または基端面から所定の間隔に位置する。

## [0097]

b) マルチスペクトル署名 (多色) および同じスペクトルダイナミックスの微細

注入可能な検査小球

小球は公知の方法に従い、マーキングされた (対象) 構造体 (測定構造体) に  
おいて生じるすべてのスペクトル署名によりマーキングされる。その結果、小球  
は任意の箇所で測定すべき生物学的対象物 (ここでは核) に注入することができ  
る。a) の場合のような日誌幾何形状は必要ない。なぜなら、各署名に対して単  
色重心が同じ箇所で位置決めされるべきだからである。マーキングされた (対象  
) 構造体 (測定構造体) から区別するために、小球は別の大きさ等級に所属する  
か、または付加的なスペクトル署名を有する。この付加的なスペクトル署名は測  
定すべき構造体、すなわち測定構造体 (準備プロトコルによる) に現れない。

## [0098]

c) 1つの別の染色体における既知の間隔の同時マーキングされた染色体領域を  
、位置決めすべき構造体 (測定構造体) を支持するものとして:

校正小球、すなわちここでは相互に既知の間隔を有する染色体領域はDNAシ  
ーケンスの試行組み合わせを用いて異なってマークされる。このDNAシーケン  
スは異なるスペクトル署名を有する。染色体校正ターゲットを位置決めすべき (   
染色体) 構造体 (測定構造体) から区別することは、例えば種々異なる蛍光強度  
により行うことができる。またはスペクトル署名の異なる蛍光色素間の異なる強  
度関係により、または測定ターゲットの蛍光マーキングの際に使用されたスペク  
トル署名とは異なる付加的な蛍光色素を使用することにより行うことができる。

## [0099]

校正ターゲットが位置決めすべき測定構造体とは別の大きさ等級に所属するこ  
ともできる。

## [0100]

(111) 間隔測定は本発明の多元素ウェーブフィールド顕微鏡により、フォト  
マルチプライヤおよび/またはカメラおよびビデオ処理装置と組み合わせて実行  
される。生物学的対象物、ここでは卵として細胞核から一連の光学的断面が記録  
される。測定構造体M1、M2、M3、...、M11は1、2、...、11のスペクト

ル署名を有する。校正ターゲットU1、U2、U3、...、U11のスペクトル署名  
は測定構造体のスペクトル署名とは、例えば容積、直径、強度またははスペクトル  
署名の数 ( $1=1, 2, \dots, L+1$ ) の点で異なる。光学的断面の画像は各スベ  
クトル署名ごとに別個に記録され、場合によりさらにバックグラウンド補正される  
。評価のためにまず、校正ターゲットが同定され、色収差が検出される。このた  
めに校正ターゲットが各スペクトル署名の下で位置決めされ、ベクトル署名の異  
なるスカラー色素マーキングを備えた校正ターゲット間の間隔が測定される。測定  
された位置 (すなわち測定されたターゲット間隔) は幾何形状に基づき計算され  
た目標位置 (すなわち実際のターゲット間隔) と比較され、これからスペクトル  
に起因するずれ (シフト) が検出される。

## [0101]

このずれ (シフト) は、位置決めすべき (対象) 構造体 (測定構造体) 間で測  
定された間隔値に対する校正値である。

## [0102]

このずれはプレパラートの光学的特性 (例えば核およびプレパラート媒体にお  
ける屈折率) に依存するから、構成は *in situ* で行わなければならない。すな  
わちこの実施例では、校正ターゲットは、浸透しマーキングすべき (染色体) 構  
造体 (測定構造体) の傍で核内に存在しなければならない。

## [0103]

さらに、位置決めすべき (対象) 構造体 (測定構造体) 間の間隔が位置決めさ  
れる。ここでは各スペクトル署名でまず、相互に依存しない、測定された強度  
係数の重心位置が検出される。すなわち、種々異なる色番号間の間隔ないしは係  
当する測定構造体の色点間の間隔、例えば赤蛍光する色点と緑蛍光する色点との  
間隔が測定される (最大強度から最大強度まで、または重心から重心まで)  
。そしてこの測定値が校正ターゲットにより検出された (種々異なるスペクトル  
署名に起因する) ずれだけ高精度に補正される。

## [0104]

測定構造体の補正された位置は比較点を基準に表される。この比較点は例えば  
対象物内で任意に示された固定の点、または校正ターゲット (例えばワーキング



された染色体領域)の重心、または何らかの方法で示された染色体テトリリーの重心とすることができる。しかしすべての測定構造体の重心座標が染色体テトリリー内にあることもできる。

#### [0105]

校正ターゲットがマルナスベクトル署名(多色)を有する微細注人可能な検査小球の形態であれば、色収差は各署名に対する重心の位置差から検出される。校正ターゲットに所属する蛍光発光の、そのために必要な同定は例えば、容積領域法または領域変化の標的セグメント化結果を平均することによって行うことができる。

#### [0106]

校正ターゲットが、マルナスベクトル署名(多色)を備え、蛍光色素マーキングされた対象領域の形態にあれば、色収差は正確に検出される。

#### [0107]

蛍光色素マーキングされた構成領域として動原体領域も適する。この動原体領域は、次のようなDNAシーケンスの対行組み合わせによりハイブリッド化される。このDNAシーケンスはすべてを同じ染色体DNA部分で結合するが、スペクトル署名の異なる蛍光色素によってマーキングされる。ハイブリッド化が首尾一貫した条件の下で行われれば、1細胞様当たり2つのマーキング領域が存在し、条件が緩和されれば、付加的な副次結合領域により付加的な動原体領域がマーキングされる。これにより構成領域の数が上昇する。これは場合により非常に有利である。

#### [0108]

(IV) 説明した測定方法は軸トモグラフィとの組み合わせでも実行することができる。このために生物学的微細な対象物、例えば細胞核がグラスファイバまたは毛細管に配置される。この細胞核では位置決めすべき測定構造体がすでに蛍光色素によりマーキングされており、またすでに校正ターゲットを含んでいる(例1参照)。軸トモグラフィにより対象物をステッピングごとに所定の角度だけ回転させ、場合により自動的にリフォーカスされる。各角度ステップから完全な2D画像ステープルまたは3D画像ステープルが記録される。

#### [0109]

回転は、2つの測定構造体ないし校正ターゲット間のそれぞれの(すなわち蛍光強度重心間の)間隔が最大になるように行われる。測定された最大間隔は実際の間隔に対応する。

#### [0110]

次に測定構造体ないし校正ターゲット間の間隔に興味があれば、すなわちその空間的絶対配置には興味がないければ、既知の測定構造体ないしは校正ターゲットから出発して、第3の測定構造体ないしは第3の校正ターゲットまでの間隔を最大にし、検出することができる。測定構造体ないし校正ターゲット間の間隔が点像分布関数の主最大値の半値幅よりも大きければ、ただ1つのスペクトル署名で十分である。これに対して間隔がそれより小さければ、測定構造体ないし校正ターゲットをマルナスベクトル署名により区別しなければならない。署名の重心(最大値)は位置決めに用いられる。探索される測定構造体が、有効点像分布関数の主最大値の半値幅よりも小さい直径を有していれば、測定構造体ないし校正ターゲットのすべての回折画像は該点像分布関数により検出される。これにより最大値を最速に検出することができる。

#### [0111]

測定構造体ないし校正ターゲットの空間における絶対的配置に興味があるなら、それぞれの重心を正確に検出しなければならない。全体の測定手続きを複数回繰り返して、統計的に評価することにより、測定構造体ないし校正ターゲットの絶対位置決め、すなわち角度測定を改善できる。

#### [0112]

前に説明した校正と、位置決めすべき構造体、すなわち測定構造体間の間隔測定を同じ生物学的対象物で実行する代わりに、校正を測定構造体に依存しないで、同種の生物学的対象物で実行することができる。この方法変形実施例では、校正ターゲットの蛍光信号と、測定構造体の蛍光信号との区別が容易になる。校正ターゲットにより検出された光学的ずれの値に基づいて、測定構造体間の間隔測定に対する校正曲線を作成することができる。この種の校正曲線により例えば、使用される液浸媒体、使用される光学系、フィルタおよび検知ユニット、使用さ

れる評価アルゴリズム、使用される生物学的対象物、測定構造体ないし校正ターゲットの位置等の屈折率および吸収の関数としてのスベクトル値を表すことができる。この特別な校正曲線からの情報は本発明の間隔測定に、とりわけ大きな精度公差が許容される場合に使用される。

## [0113]

例3：3次元に膨張した対象物を多次元ウェーブフィールド顕微鏡、本発明の校正方法および同時画像記録によって際立し表示する。

## [0114]

通常、生物学的微細対象物から3D間隔が連続的記録によって得られる。例えば焦点点レーザ走査顕微鏡では3D対象物容積を点ごとまたは線ごとに走査することにより得られる。第2の方法は、対象面からの蛍光放射を検知アレイの位置決めによって記録することに基づくものである。この検知アレイの位置決めは対象面と共役の中間画像面で行われ、通常は中間画像面の位置が固定される。生物学的対象物の3D情報を得るために、対象物は連続的に固定の中間画像面に対して共役の対象面を通して運動される。そのたびに該当する蛍光放射の2D画像データ集合が記録される。および/または対象物は軸トモグラフィ法によって種々異なる回転角度だけ回転され、そのときに固定の中間画像面に対して共役の対象面の2Dデータ集合が記録される。

## [0115]

対象点、対象ライン、または対象面のこの連続的記録は種々の欠点を有する。例えば、3Dデータ集合の記録が褐色すれば、所定のスベクトル番号でマーキングされた対象点の蛍光分布において本発明により検出された3D重心がずれてしまう。別の欠点は、3Dデータ記録が十分に高速ではなく、恒久的には安定しない、すなわち運動する対象物の場合、とりわけ数nm/sまでの速度による物理的条件の下で運動する生体細胞の核において染色体領域が蛍光マーキングされるような *in vivo* マーキングの場合には、満足できる画像品質が保証されない。

## [0116]

対象物が運動する場合でも満足できる結像品質を得るために、本発明では蛍光マーキングされた対象物を3Dデータ集合を同時記録する。このために対象物の位

ら放射された所与のスベクトル番号の蛍光が光学的要素、例えばハーフミラーによってN個の部分ビームに分割され、N個のデータアレイに結像される。データアレイはN個の異なる中間画像面に存在し、この中間画像面はN個の異なる対象面に対して共役である。結像等式に基づいた簡単な推定により、中間画像面(検知面)の間隔は、10 $\mu$ mの軸方向広がりを持つ対象領域と、従来の像距離と開口数の大きい対物レンズとを同時に記録する場合には、 $\leq 20$  nmのオーダーで1個域だけ変化しなければならないことが判明した(使用される対物レンズに依存して)。別のN個の中間光学系により、高精度間隔測定のために、記録すべきN個の対象面に関連する対象領域を、同じ適切な大きな寸法の検知アレイ(ないしは $\leq N$ の検知アレイ)の別の領域に結合することができる。この場合、L個の検知アレイの所定の部分にはN個の共役対象面の1つが相当する。例えば数 $\mu$ mの広がり小さな対象領域を測定のためにウェーブフィールド顕微鏡に基ずくように粗く位置決めする。すなわち、その重心が所定の(中間)画像面B0に対する検知点増分分布関数により定められた、記録に使用される顕微鏡対物レンズの縦断容積のほぼ中心に来るように粗く位置決めする。3D対象物から発する蛍光をそのスベクトル番号に従って別個にN個の部分ビームに分割する。このN個の部分ビームはN個の検知アレイ(例えばそれぞれ $8 \times 8$ 、 $16 \times 16$ または $64 \times 64$ のピクセルサイズ)に結像され、それらの位置決めによりN個の共役対象面からの蛍光放射の記録が検知点増分分布関数(画像面B0を基準として)の最大値を中心に行われる。

## [0117]

例えばそれぞれ20 nmの間隔を有する対象物を同時に記録する場合、簡単な推定によれば上記の前提の下で、共役中間画像面をそれぞれ少なくとも100 $\mu$ m(点像分布関数の最大値の近傍で)だけずらさなければならない。または相応の小さな光学的個別補正を、関連する対象部分の同時検知の際に相応するピクセル数のただ1つの検知アレイ(または $\leq N$ )で実行しなければならない。蛍光放射を例えば同じ強度の $N=20$ の部分ビームに分割する場合には、 $N=20$ の検知アレイの各々(または検知アレイ部分)により単位時間当たりに記録されるフォトンの数はほぼ同じ係数だけ低下する。蛍光マーキングされた対象物の位

決め精度はこの場合、フォトン統計の悪化により推定で係数 $f$  (2.0) だけ低下する。この欠点は、記録時間を係数 $N$  (例えば $N=2.0$ ) だけ上げることにより除去できる。この場合、対象物の同時記録は、連続記録の場合と同じ程度良く特検する。検色特性を有する対象物の場合、同時3次元記録の利点は、観察累積のすべてのクーゲット (両方のスペクトル署名の) に対して類似の検色特性が存することである。検色に起因する蛍光放射像の重心のずれがこのことにより緩和される。

## [0118]

時間的にダイナミックな媒体 (例えばin vivo でマーキングされた細胞) を有する対象物の場合は、連続記録に対して係数 $N$ だけ短縮された記録時間 (例えば2.0秒ではなく1秒) の場合、個々の対象点の位置決め精度は推定で係数 $f$  (  $N$ ) だけ ( $N=2.0$  の場合は4.5) 低下する。

## [0119]

例えばウェーブフィールド顕微鏡における3D位置決め精度が約 $\pm 3\text{ nm}$ の場合、画像前ごとに1秒の連続記録時間により、同時記録の前記条件の下で位置決め精度が、そのほかは同じ条件で2.0対象面を同時記録すると推定で $\pm 4.5^*$   $3\text{ nm} \approx 14\text{ nm}$ に低下する。(例として) 仮定した $5\text{ nm/s}$  (平均ずれ) の対象物運動では、実際の位置決め精度は、2.0秒の全体記録時間による連続記録の際に検色効果を考慮しなくてもすでに倍程に大きくなる。ここで本発明によれば、前記の対象面の同時記録は1つの光軸についてだけでなく、2つおよび3つの直交する光軸についても行われる。

## [0120]

必要な場合には、この本発明の同時画像記録を問題なしに従来の連続画像記録と組み合わせることができる。

## [0121]

例4: 多次元ウェーブフィールド顕微鏡を使用したDNA順序決定  
公知の方法、例えばポリメラゼ連鎖反応を用いて、分析すべきDNAシーケンスのすべての相補的サブシーケンスを複製することができる。サブシーケンスはすべて分析すべきシーケンスの同じヌクレオチドから開始する。分析すべき断

片はすべて3' エンドにおいて基質蛍光色素マーカ $\alpha$ によりマーキングされる。別のエンド、5' エンドないし所定の中間箇所においては、スペクトル署名の異なる蛍光色素マーカ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ によりそれぞれマーキングされる。これはヌクレオチドがベース、アデニン (マーカ $\alpha$ )、グアニン (マーカ $\beta$ )、シトシン (マーカ $\gamma$ ) またはチミン (マーカ $\delta$ ) をキャリアーしているかによる。

## [0122]

使用される蛍光色素マーカのすべての形式はそのスペクトル署名において、これら蛍光色素マーカ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  (場合によりさらに多数) は相互に別個に識別することができるように異なる。1つの所定の蛍光色素マーカは本発明に よれば、1から多数の同じまたは種々異なる蛍光色素分子により形成される。ここで蛍光色素マーカの長さおよび組成は、開始部にある蛍光色素マーカ $\alpha$ の強度分布と終端部にある蛍光色素マーカ ( $\beta$  または  $\gamma$  または  $\delta$  または  $\epsilon$  または  $\zeta$  場合はより別のベースに対する別の) の強度分布の重心間の間隔測定が多次元ウェーブフィールド顕微鏡の方法により可能であるように選択される。すなわち蛍光マーカに対するリンク分子は例えば1/2ヌクレオチド間隔よりも小さくなければならない。本発明によれば、比較的に長いリンク分子を使用することもできる。これは、リンク分子が剛性の高い構造を有し、これに起因して間隔変動が十分に小さく、例えば $< 1/2$ ヌクレオチド間隔である場合である。

## [0123]

このようにマーキングされたサブシーケンスは分析すべきDNAシーメンスを完全に表す。蛍光マーカ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  ないし基質蛍光マーカ $\alpha$ はそれぞれ1つまたは複数の蛍光色素分子を含むことができる。DNAサブシーケンスはすべて適切なキャリアーに固定され、このキャリアーは線形シーケンスとして存在する。

## [0124]

蛍光色素マーキングされたDNA断片はDNAコーミング技術によって線形に電列される。従来の一次元ウェーブフィールド顕微鏡とは異なり本発明の多次元ウェーブフィールド顕微鏡では、DNA列をシステムの光軸の方向に付加的に正確に整列することは必要ない。DNAシーケンスは有利には4角形のグラフスファイバに取り付けられる。このガラスファイバの屈折率は周囲の媒体の屈折

準とはほとんど違わない。ここでは所定の角度、とりわけグラスファイバの軸に対して直交する角度での照射が行われる。そしてDNAシークエンスの重心相互の平均間隔は、蛍光信号の記録に使用された点像分布関数の最大半値幅よりも大きい。別の方法が、3' エンドをスベクトル署名 $\alpha$ の微細小珠で結合し、続いてDNA糸を光学的ピンセット工員により伸張する。ここでは“ピンセットレーザ”の波長を適切に選択しなければならない。

#### [0125]

DNAシークエンスを偏形化ないし配向した後、このようにして作製されたプレパレートが固定され、例えば低温条件下による分子運動が低減される。限一的にDNA末端部を結晶性に整列された固体構造体に埋め込むことができる。測定のためには、DNA末端部がガラスファイバ、DNA対象物に校正目的で、別のとりわけ多色微細対象物がガラスファイバ、DNA対象物に校正目的で、別のDNA末端部の固定固体に取り付けられる。校正対象物は付加的に、a, l, c, またはgでないスベクトル署名を含む。DNA列の偏形化は、すべてのヌクレオチドが分析すべきDNA相補列の合成の際に適切に蛍光マーキングされるなる省略することができる。

#### [0126]

固定されたDNAシークエンスは多次元ウェーブフィールド顕微鏡に取り付けられる。このとき偏形化DNAサブシークエンスは定在液面に次のように配向される。すなわち、 $n$ と $a$ ないし $g, c$ または $t$ との正交な間隔測定（間隔 $\leq 1 \times 10^{-10}$  m）が強度重心の検出と結像特性の校正の後で可能であるように配向される。

#### [0127]

測定は、in situ 校正の場合、本発明の校正方法を適用して行われる。蛍光色素マーカの信号は、適切に適合されたステップ幅を有するウェーブフィールド顕微鏡において相互に分離して記録される（有利にはデジタルで）。蛍光マーカの間隔とそのスベクトル署名から、分析すべきDNA破片のDNAベースシークエンズが検出される。

#### [0128]

スベクトル分離の代わりにまたはこれに追加して、蛍光寿命時間パラメータを

分析することができる。詳細の第1フェーズでは、蛍光色素マーカ信号の重心の粗検出が行われ、この情報を基礎として、DNAシークエン스에所属する信号が上の述べたような間隔基準に従い、別のDNAシークエン스에所属する信号から分離される。詳細の第2フェーズでは、スベクトル分離されて記録され、変調された蛍光色素マーカの信号が適切に適合された間隔によって分析される。ここから、DNAシークエンスの開始部にある蛍光色素マーカ信号と終端部にある蛍光色素マーカ信号の重心の間隔が分子レベルの精度で検出される。ここで校正対象物で行われた測定は間隔差の補正、例えば色収差の補正に使用される。詳細の第3フェーズでは、DNAシークエンスの長さに相応する蛍光色素マーカ信号の間隔が長さの増大後に、終端部の蛍光色素マーカ（例えばa, g, c, t）の形式に従って分離して配列される。このようにして達成された構成は、従来の方法で達成されたパターンに相応する。このパターンから公知の方法に従って所望のシークエンズ情報を取り出すことができる。

#### [0129]

線形シークエンズないしは既知の配列構造を有する巨大分子の場合も同じように行う。ここで蛍光色素マーカの数と形式は分子構成要素の数と形式に依存する。

#### [0130]

個々のDNA列の測定が光軸の方向における整列を必要とする場合には、本発明により以下のように措置される。DNA鎖の既知の終端部をスベクトル署名 $\alpha$ の蛍光マーカに加えて化学的マーカによりマーキングするのである。DNA鎖プレパレートの残余部分、とりわけ終端部の蛍光マーカa, c, g, tのマーキングは冒頭に述べたように実行される。終端部のベースおよび/またははストップヌクレオチドのマーカ、および場合により整列すべきDNA鎖の別のベースは電荷を有する（例えば負の）。

#### [0131]

DNA鎖の整列は顕微鏡法の前または間に行うことができ、まず顕微鏡法の前

#### [0132]

の整列方法が説明される。

埋め込まれたDNA鎖はイオン強度の低いバッファ中の溶液で、特別の設置され



成される。そして 2 つの焦点面の間の空間に、平坦な表面を備えた第 2 の平行光束が発生する。この光束は所定の角度で第 1 の光束に対して延在し、これと共に対象空間で、最大光強度の域を有する一次元定在ウェーブフィールドと干渉する。

#### [0140]

第 1 の対物レンズには第 2 の対物レンズが間隔を置いて、鏡像的に対向して配向されている。これによりこれら 2 つの対物レンズは 3 次元対象空間の 2 つの対向する側に来る。この第 2 の対物レンズには、コヒーレントな光ビームに対する第 3 と第 4 (リアルまたはバーチャル) の照明源が次のように配属されている。すなわち、2 つの照明源の光ビームが、第 1 の対物レンズに対して鏡像したのと同じように、後方の、対象空間とは反対側のこの第 2 の対物レンズの焦点面にフォーカシングできるように配属されており、この第 2 の対物レンズの 2 つの焦点面の間の空間で、一次元定在ウェーブフィールドと干渉することができる。そして対象空間では第 1 の対物レンズの一次元定在ウェーブフィールドと干渉することができ、これにより 3 次元ウェーブフィールドが発生し、このウェーブフィールドは 3 次元空間に連続する最大強度の点を有している。

#### [0141]

2 次元ウェーブフィールドを形成するために (すなわち 1 つの面での最大強度の点)、前記の構成が次のように変更される。すなわち、第 1 および第 2 の対物レンズを使用するが、そのうちの一方を照明源と結合する。

#### [0142]

またはただ 1 つの対物レンズだけを使用し、これを第 3 の照明源と結合する。第 3 の照明源のコヒーレントな光ビームを他の 2 つの照明源の光ビームに、このただ 1 つの対物レンズで入力結合する。これにより相応する 3 つの焦点が焦点面に二等辺三角形を形成し、その中心に光軸が延在する。対象空間では 3 つすべての光ビームが顕微鏡対物レンズを光軸に対して同じ角度で通過するが、それぞれ方向が異なる。

#### [0143]

ただ 1 つの対物レンズを使用する、多次元ウェーブフィールド顕微鏡を形成す

るための本発明によるウェーブフィールド顕微鏡タイプ 11 の変形実施例は、3 次元ウェーブフィールドを形成するのに使用できる。このために 4 つの光ビームを同じ対物レンズに偏向する。これはこれに相応する 4 つの焦点が後方焦点面で等辺の四角形を形成するように行う。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

1. Inventor's name and address IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C1201/68 PCT/DE 98/01908	
2. Applicant's name and address IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C1201/68 PCT/DE 98/01908	
3. Title of the invention IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C1201/68 PCT/DE 98/01908	
4. Abstract IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C1201/68 PCT/DE 98/01908	
5. Claims IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C1201/68 PCT/DE 98/01908	
6. Description of the invention IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C1201/68 PCT/DE 98/01908	
7. Drawings IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C1201/68 PCT/DE 98/01908	
8. References cited IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C1201/68 PCT/DE 98/01908	
9. International classification IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C1201/68 PCT/DE 98/01908	
10. Other information IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C1201/68 PCT/DE 98/01908	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the nature of passage	Where the document is
A	WO 96 31522 A (NEW YORK UNIVERSITY) 10 October 1996 see page 4, last paragraph see page 12, line 18 - line 20 see page 57, line 13 - line 15 see page 70, line 18 - line 26 see page 71, line 12 - page 72, line 33 see page 92, paragraph 1 see page 140, line 1 - line 3	10, 11
A	B. BAILEY ET AL: "Optical subsectioning and multiple focal plane imaging in the standing-wave fluorescence microscope" PROCEEDINGS SECOND ANNUAL MEETING OF THE MICROSCOPY SOCIETY OF AMERICA, New Orleans, US, 31 July - 5 August 1994, pages 158-159 XP002085004 see page 159, line 15 - line 17	11
A	WO 96 24082 A (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 8 August 1996 see page 3, line 14 - page 4, line 11 see page 6, line 26 - page 7, line 6 see page 15, line 6 - page 17, line 27; figures 2-6	1
A	W. DENK ET AL: "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy" SCIENCE, vol. 248, no. 4951, 6 April 1990, pages 73-76, XP00331741, Washington DC cited in the application see abstract	8
A	US 4 621 911 A (LAWRI) 11 November 1986 cited in the application	
A	V. KRISHNANURTHI ET AL: "Image processing in 3-D standing-wave fluorescence microscopy" PROCEEDINGS SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING, vol. 2655, - 1996 pages 18-25, XP002085003	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family and report			IPC Class. (Int. Cl. 7)		Publication No.	
Pub. No.	Pub. Date	Pub. No.	Pub. Date	Pub. No.	Pub. Date	Pub. No.
WO 9416594	A	18-08-1994	US 5394268 A	28-02-1995	US 5394268 A	28-02-1995
			AU 691173 B	14-03-1998	AU 691173 B	14-03-1998
			AU 6169934 A	29-08-1994	AU 6169934 A	29-08-1994
			CA 2155521 A	18-08-1994	CA 2155521 A	18-08-1994
			EP 0682730 A	22-11-1995	EP 0682730 A	22-11-1995
			JP 8509817 T	15-10-1996	JP 8509817 T	15-10-1996
			US 5801881 A	01-09-1998	US 5801881 A	01-09-1998
EP 0732584	A	18-09-1996	US 5624845 A	29-04-1997	US 5624845 A	29-04-1997
			US 5609744 A	11-03-1997	US 5609744 A	11-03-1997
			US 5607558 A	04-03-1997	US 5607558 A	04-03-1997
			US 5538993 A	23-07-1996	US 5538993 A	23-07-1996
			JP 8256755 A	08-10-1996	JP 8256755 A	08-10-1996
WO 9631522	A	10-10-1996	US 5720920 A	24-02-1998	US 5720920 A	24-02-1998
			AU 5532196 A	23-10-1996	AU 5532196 A	23-10-1996
			EP 0871640 A	21-10-1998	EP 0871640 A	21-10-1998
WO 9624082	A	08-08-1996	US 5671065 A	23-09-1997	US 5671065 A	23-09-1997
			AU 4773896 A	21-08-1996	AU 4773896 A	21-08-1996
			CA 2210801 A	08-09-1996	CA 2210801 A	08-09-1996
			EP 0807273 A	19-11-1997	EP 0807273 A	19-11-1997
US 4621911	A	11-11-1986	NONE		NONE	

Printed in Japan by the Patent Office

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	特許番号	特許番号 (参考)
G01N 33/50	F I	F
// C12N 15/09	G01N 33/50	C12N 15/00
(71) 出願人	Seminarstrasse 2, D-69117 Heidelberg, Germ	A
any		
(72) 発明者	ヨアヒム ブラドル	
	ドイツ連邦共和国 シュレースハイム ヲ	
	ックス-ブランケンシュトラーゼ 33	
(72) 発明者	ベルンハルト シュナイダー	
	ドイツ連邦共和国 シュバイヤー フィン	
	ケンゾエーク 14	